

RECOVERY OF POLY-3-HYDROXYLACTIC ACID FROM MICROBIAL BODY

Patent Number: JP11266891
Publication date: 1999-10-05
Inventor(s): TANAKA AKINOBU; UCHIYAMA SEIJI; YOSHIDA SHOGO; TAWARA TORAICHI
Applicant(s): MITSUBISHI GAS CHEM CO INC
Requested Patent: JP11266891
Application Number: JP19980072206 19980320
Priority Number(s):
IPC Classification: C12P7/62
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject compound having a complete biodegradability and bio-compatibility and not polluting an environment in a high yield by heating a suspended microbial bodies containing a poly-3-hydroxylactic acid under a specific condition and then isolating the above compound by adjusting pH thereof.

SOLUTION: This method for recovering a poly-3-hydroxylactic acid from microbial bodies is provided by heating a suspended microbial bodies containing the poly-3-hydroxylactic acid at a temp. of ≥ 50 deg.C, preferably at a temp. of 80-120 deg.C on the acid side of pH 7, preferably pH 8-12 and then isolating the poly-3-hydroxylactic acid to obtain a high purity poly-3-hydroxylactic acid in a high yield and by a small number of process steps. Further, the poly-3-hydroxylactic acid is produced and accumulated in the microbial cells as an energy storing material in many microorganisms, has a complete biodegradability and bio-compatibility, and is useful as a thermoplastic plastic without having issues of an environment pollution, a waste material treatment, a resource recycling, etc.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-266891

(43) 公開日 平成11年(1999)10月5日

(51) Int.Cl.⁸

識別記号

F I

C 1 2 P 7/62

C 1 2 P 7/62

// (C 1 2 P 7/62

C 1 2 R 1:01)

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平10-72206

(22) 出願日 平成10年(1998)3月20日

(71) 出願人 000004466

三菱瓦斯化学株式会社

東京都千代田区丸の内2丁目5番2号

(72) 発明者 田中 昭宣

新潟県新潟市太夫浜字新割182番地 三菱

瓦斯化学株式会社新潟研究所内

(72) 発明者 内山 征二

新潟県新潟市太夫浜字新割182番地 三菱

瓦斯化学株式会社新潟研究所内

(72) 発明者 吉田 省吾

新潟県新潟市太夫浜字新割182番地 三菱

瓦斯化学株式会社新潟研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物菌体からのポリ-3-ヒドロキシ酪酸の回収方法

(57) 【要約】

【課題】 ポリ-3-ヒドロキシ酪酸を含有する微生物菌体から、少ない工程数で安価に、かつ高純度のポリ-3-ヒドロキシ酪酸を高収率で回収する方法を提供する。

【解決手段】 ポリ-3-ヒドロキシ酪酸を含有する微生物菌体の懸濁液をpH2未満の酸性側で50℃以上に加熱し、次いで該懸濁液のpHを7を超えるアルカリ性側に調整した後、該懸濁液よりポリ-3-ヒドロキシ酪酸を分離する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ポリー-3-ヒドロキシ酪酸を含有する微生物菌体の懸濁液をpH2未満の酸性側で50℃以上に加熱し、次いで該懸濁液のpHを7を超えるアルカリ性側に調整した後、該懸濁液よりポリ-3-ヒドロキシ酪酸を分離することを特徴とする微生物菌体からのポリ-3-ヒドロキシ酪酸の回収方法。

【請求項2】 酸性側での加熱時のpHが1以下である請求項1の回収方法。

【請求項3】 酸性側での加熱温度が80～120℃であり、その後80℃以下の温度においてpH7を超えるアルカリ性側に調整する請求項1記載の回収方法。

【請求項4】 アルカリ性側に調整する場合のpHが8～12である請求項1記載の回収方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ポリ-3-ヒドロキシ酪酸を含有する微生物菌体から、ポリ-3-ヒドロキシ酪酸を回収する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】ポリ-3-ヒドロキシ酪酸（以下PHBと記す）は、多くの微生物のエネルギー貯蔵物質として菌体内部に生成・蓄積される、完全生分解性および生体適合性を有する熱可塑性ポリエステルである。近年、合成プラスチックが環境汚染、廃棄物処理および資源循環の観点から深刻な社会問題となっており、それ故PHBは「クリーンプラスチック」として注目され、その実用化が切望されている。PHBの製造は、特公平03-65154号公報、特公平02-20238号公報、特公平05-997号公報等

に提案されているように、細菌、例えばシュドモナス（*Pseudomonas*）属、アルカリゲネス（*Alcaligenes*）属、プロトモナス（*Protomonas*）属、アゾトバクター（*Azotobacter*）属、ノカルジア（*Nocardia*）属、メチロバクテリウム（*Methylobacterium*）属等の細菌を培養し、菌体内にPHBを顆粒状に蓄積せしめた後、その菌体からPHBを回収することによって行われる。

【0003】菌体からのPHBの回収方法は、PHBが可溶である溶剤により菌体からPHBを抽出する方法と、PHB以外の菌体構成成分を可溶化させて除くことによりPHB顆粒体を得る方法が知られている。溶剤抽出によってPHBを分離精製する方法においては、PHBが可溶である溶媒として、例えば1,2-ジクロロエタンやクロロホルムといったハロゲン化炭化水素が用いられる。この場合菌体を予め乾燥する等、溶媒が菌体中のPHB顆粒体と接触できるようにするための工程が必要となる（特開昭57-65193号公報等）。また、これらの方法においてはPHBを実用に値する濃度（例えば5%）に溶解したハロゲン化炭化水素が極めて粘稠となり、抽出工程後溶媒に溶解しなかった菌体残渣とPHBを含む溶媒層との分離が困難となる。さらに、溶媒層か

らPHBを回収率良く再沈殿させるためには多量の貧溶媒（例えばメタノール等）の添加が必要であり、工程には大容積の容器が必要となるとともに溶媒の使用量は膨大なものとなり、従って溶媒の回収コストと損失溶媒のコストがかさみ、経済的な方法とはいえない。PHBが可溶であり、かつ水と混ざり合う溶媒、例えばジオキサン（特開昭63-198991号公報）またはプロパンジオール（特開平02-69187号公報）のような親水性の溶媒を用いた抽出方法も提案されている。これらの方法は乾燥菌体のみならず湿潤菌体からもPHBを抽出することが可能である点と、菌体残渣と分離した溶媒層を冷却するだけでPHBの再沈殿が行われる点で好ましい方法と言える。しかしながら、これらの方法においてもPHBを溶解した溶媒の粘稠性の問題は未解決であり、また抽出率が（従って回収率も）劣ること等の欠点も有している。

【0004】一方、PHB以外の菌体構成成分を可溶化して除くことによってPHB顆粒体を得る方法として、*J.Gen.Microbiology* vol19 198～209頁（1958）には菌体懸濁液を次亜塩素酸ナトリウムで処理することによりPHB以外の菌体構成成分を可溶化してPHB顆粒体を得る方法が記載されている。この方法は簡単ではあるが、多量の次亜塩素酸ナトリウムを使用する必要があるためにそのコストが高いこと、加えてPHBが多くの用途に対して不適当になるまでの著しい分子量低下が引き起こされることなどから、実用には適さない。特公平04-61638号公報には、PHBを含有する菌体懸濁液を100℃以上で加熱処理し、次いで蛋白質分解酵素処理と、リン脂質分解酵素処理あるいは過酸化水素処理との組み合わせによりPHB以外の菌体構成成分を可溶化して除いてPHB顆粒体を得る方法が提案されている。また、不純物の除去方法として界面活性剤で処理する方法も記載されている。このように多段階の工程を経ることによって、純度的には良好なPHBを得ることができるが、処理工程が非常に多く、複雑であり、そのために経費がかかる等の欠点を有している。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、従来技術における上記のような課題を解決し、少ない工程数で安価にPHB含有菌体からPHB以外の菌体構成成分を効率よく除き、かつ純度の高いPHBを高収率で得るためのPHBの回収方法を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、少ない工程数で安価にPHB含有菌体からPHB以外の菌体構成成分を効率よく除き、かつ純度の高いPHBを高収率で得るためのPHBの回収方法に関して鋭意検討を行った結果、PHB含有菌体の懸濁液をpH2未満の酸性側で50℃以上に加熱することにより、微生物菌体が良好に破壊されることを見だし、更にその後pHが7を超えるアルカリ性側に調整し、PHBを菌体懸濁液より分離

することによりPHB以外の菌体構成成分が良好に除去され、高純度のPHB顆粒体を回収できることを見だし本発明に到達した。即ち、本発明によれば、PHBを含有する微生物菌体の懸濁液をpH2未満の酸性側で50℃以上に加熱し、次いで該懸濁液のpHを7を超えるアルカリ性側に調整した後、該懸濁液よりPHBを分離する微生物菌体からのPHBの回収方法が提供される。

【0007】菌体を破壊する既知の方法としては、超音波処理、ワーリングブレンダー等のブレンダー、リゾチームのような酵素による処理、菌体の凍結融解を繰り返す処理等があるが、いずれも工業的規模においては実用的ではない。特公平04-61638号公報には、PHBを含有する菌体懸濁液を100℃以上で加熱処理し、次いでタンパク質分解酵素処理と、リン脂質分解酵素処理あるいは過酸化水素処理との組み合わせによりPHB以外の菌体構成成分を可溶化して除いてPHB顆粒体を得る方法が記載されているが、ここでは核酸類の変性および可溶化を目的として加熱処理を行っている。PHBを含有する菌体懸濁液を100℃以上で加熱処理することによっても、一部の菌体は破壊されていたものと推察されるが、加熱時のpH条件が中性付近であったため十分な菌体破壊が行われず、従って高純度のPHBを得るために加熱処理後に多段階にわたる複雑な工程を行う必要が生じたものと思われる。

【0008】本発明者らは、PHBを含有する菌体懸濁液をpH2未満の酸性側で50℃以上に加熱することによって、菌体の破壊が非常に良好に行われ、その後pHを7を超えるアルカリ性側に調整し、該懸濁液よりPHBを分離することによりPHB以外の菌体構成成分が非常に良好に除去され、そのためそれ以上の多段階にわたる複雑な工程を経ることなく、高純度のPHBを取得できることを見出した。PHBは脂肪族ポリエステルであるため、水性懸濁液中で加熱すると加水分解を受け、特に水性懸濁液が酸性またはアルカリ性の場合に著しく加水分解を受けて分子量が低下してしまうと考えられていたが、本発明の方法によると、PHBを含有する菌体懸濁液をpH2未満の酸性側で50℃以上に加熱しても、PHB分子量は100万程度の大きさを保持し、著しい分子量低下を避けることができた。

【0009】

【発明の実施の形態】以下に本発明の詳細について説明する。本発明に用いられるPHBを含有する菌体は、PHBを菌体内に蓄積した細菌細胞であればどのようなものでもよく、このような細菌として例えば、アゾトバクター ヒネランディー (*Azotobacter vinelandii*)、アルカリゲネス ユウトロフス (*Alcaligenes eutrophus*)、メチロバクテリウム エクストルクエンズ (*Methylobacterium extorquens*) 等の種に属する菌株が挙げられる。その菌体は、上記の細菌等をグルコース、フラクトース、メタノール、酢酸、酪酸などの炭素源、硫酸

アンモニウム、硝酸アンモニウム、ペプトンなどの窒素源、リン酸カリウム、リン酸ナトリウムなどのリン酸源およびその他細菌の増殖に必要なミネラル、微量栄養源を含む培地で、炭素源以外の菌体増殖に必要な栄養素などが増殖の制限因子となるようにして好氣的に培養することによって得られる。

【0010】PHB含有菌体の細胞を破壊するのに必要とされる加熱処理時のpHは、加熱温度および加熱時間により異なるが、pH2未満の酸性側であれば良く、pH1以下とすることが好ましい。pHを酸性側に調整する際に用いる酸の種類は特に限定されず、硫酸、塩酸、硝酸、リン酸などの無機酸類、蟻酸、酢酸、クロロ酢酸などの有機酸類を用いることができ、これらの中で好ましいのは無機酸類であり、中でも硫酸が好適に使用される。加熱処理時の温度は、加熱時のpHおよび加熱時間により異なるが、50℃以上であれば良く、80～120℃とすることが好ましい。加熱処理の時間は、加熱時のpHおよび加熱温度により異なるが、少なくとも10分間以上、好ましくは20分～5時間加熱する。このようにPHB含有菌体の細胞を破壊するのに必要とされる加熱処理条件は、加熱温度、加熱時のpHおよび加熱時間を適宜組み合わせることによって任意に設定することができる。このような加熱処理条件として、例えば加熱温度80℃でpH0.1、加熱時間1時間、あるいは加熱温度100℃でpH0.3、加熱時間1時間、あるいは加熱温度120℃でpH1.0、加熱温度1時間などが挙げられる。また、加熱処理時の微生物の菌体濃度は1～300g/kg、好ましくは50～250g/kgにすることができる。

【0011】本発明においては酸性側で加熱後にpHを、pH7を超えるアルカリ性側にする必要がある。その場合pH8～12とすることが好ましい。酸性側での加熱温度が80℃を超える場合には、菌体懸濁液の温度を80℃以下に冷却した後菌体懸濁液のpHをアルカリ性側に調整することが好ましい。pHをアルカリ性側に調整する際に用いるアルカリの種類は特に限定されず、例えば水酸化ナトリウム、アンモニアなどを使用することができる。所定のアルカリ性側のpHに調整した後、そのpHの値を1分～3時間、好ましくは10分～2時間保持することが好ましい。アルカリ性側にpHを調整した後の菌体懸濁液からのPHBの分離は、例えば濾過、遠心分離などにより行うことができる。菌体懸濁液からのPHBの分離操作に引き続き、アルカリ水溶液やメタノール、アセトン等の有機溶剤を用いてPHBの洗浄を行うことにより、さらに高純度のPHBを得ることもできる。

【0012】特に高純度のPHBを得る必要があるときには、PHBの分離および洗浄操作の後に、例えば酵素、酸化剤、界面活性剤またはこれらを組み合わせた化学的処理等を行うこともできる。

【0013】

【実施例】次に本発明を実施例によって更に詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1

プロトモナス エクストルクエンズ (Protomonas extorquens) [メチロバクテリウム エクストルクエンズ (Methylobacterium extorquens) と改名] K (微生物寄第8395号) をメタノールを唯一の炭素源とする完全合成培地を用いて、窒素供給を菌体増殖の制限因子になるようにして連続培養を行い、PHBを含有する菌体の培養液を得た。培養液の菌体濃度は10%、菌体中のPHB含有量は乾燥菌体重量に対して60%、乾燥菌体中の蛋白質含有量は13.3%、PHB分子量は24*

*7万であった。この培養液を硫酸でpH0.5にした後、100℃で1時間加熱した。酸性加熱後の培養液を50℃に冷却し、水酸化ナトリウムでpHを8.5、9.5及び10.5に調整して、50℃で1時間攪拌した後、2000Gで10分間遠心分離した。得られた沈殿をアルカリ調整時と同じpHのアルカリ水溶液に懸濁し50℃で1時間攪拌した後、2000Gで10分間遠心分離することにより洗浄した。遠心分離により得られた沈殿を乾燥した。PHBの回収率、PHB純度、蛋白質含量およびPHB分子量は表-1の通りであった。酸性加熱後、pH調整を行わずに上記と同様の操作を行った場合を比較例として表-1に示した。

【0014】

【表1】

表-1

pH	PHB純度 (%)	蛋白質含量 (%)	PHB分子量 (万)	PHB回収率 (%)
8.5	93	1.2	102	92
9.5	96	0.8	105	92
10.5	97	0.7	101	91
0.5 (比較例)	72	11.5	104	95

【0015】実施例2

実施例1と同様にして得た培養液を用い、加熱温度およびpHを変えて1時間酸性加熱処理を行った。pHの調整は硫酸を用いて行った。酸性加熱後の培養液を50℃に冷却し、水酸化ナトリウムでpHを10に調整し、50℃で1時間攪拌した後、2000Gで10分間遠心分離した。得られた沈殿をアルカリ調整時と同じpHのアルカリ水溶液に懸濁し50℃で1時間攪拌した後、20*

※00Gで10分間遠心分離することにより洗浄した。遠心分離により得られた沈殿を乾燥した。PHBの回収率、PHB純度、蛋白質含量およびPHB分子量は表-2の通りであった。pH調整を行わずに加熱し、その後上記と同様の操作を行った場合を比較例として表-2に示した。

【0016】

【表2】

表-2

加熱温度 (℃)	pH	PHB純度 (%)	蛋白質含量 (%)	PHB分子量 (万)	PHB回収率 (%)
80	0.1	95	0.7	96	95
100	0.5	97	0.6	102	94
120	1.0	97	0.7	95	94
(比較例)80	5.3	73	5.8	156	95
(比較例)120	5.3	82	3.4	113	95

【0017】実施例3

実施例1と同様にして得た培養液を用い、加熱温度およびpHを変えて1時間酸性加熱処理を行った。pHの調整は硫酸を用いて行った。酸性加熱後の培養液を50℃に冷却し、水酸化ナトリウムでpHを10に調整し、50℃で1時間攪拌した後、2000Gで10分間遠心分離した。得られた沈殿をアルカリ調整時と同じpHのアルカリ水溶液に懸濁し50℃で1時間攪拌した後、20★

★00Gで10分間遠心分離することにより洗浄した。その後更にメタノールで2回、さらにアセトンで2回洗浄した。乾燥後に得られたPHBの回収率、PHB純度、蛋白質含量およびPHB分子量は表-3の通りであった。

【0018】

【表3】

表-3

加熱温度 (℃)	pH	PHB純度 (%)	蛋白質含量 (%)	PHB分子量 (万)	PHB回収率 (%)
80	0.1	99	0.3	96	94
100	0.5	99	0.2	102	94

(5)

特開平11-266891

7

8

120

1.0

99

0.2

95

93

【0019】

*-3-ヒドロキシ酪酸を高収率で回収することができる。

【発明の効果】ポリ-3-ドロキシ酪酸を含有する微生物菌体から、少ない工程数で安価に、かつ高純度のポリ*

フロントページの続き

(72)発明者 田原 寅一

新潟県新潟市太夫浜字新割182番地 三菱

瓦斯化学株式会社新潟研究所内